

DETECTION OF PHYSIOLOGICALLY ACTIVE MATERIAL

Patent Number: JP60224041
Publication date: 1985-11-08
Inventor(s): NAKANISHI TOSHIHARU; others:
Applicant(s): TORAY KK
Requested Patent: ☐ JP60224041
Application JP19840080107 19840423
Priority Number(s):
IPC Classification: G01N21/17; G01N33/543
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PURPOSE: To enable objective detection with a small quantity of sample by determining quantitatively the flocculating state of pulverous particles from the comparison between the diffraction pattern measured by irradiating coherent light to the pulverous particles in a medium liquid and the diffraction pattern of the unflocculated sample.

CONSTITUTION: The light beam from a laser light source 1 is irradiated via an aperture 3, etc. to a sample cell part 4 having a sample holding mechanism part 15 and the diffracted light thereof is formed an image as a diffraction pattern onto a converging plane 6 by a Fourier transform lens 5. The intensity distribution thereof is measured by using a photoelectric tube 7 and the surface of the plane 6 is by a scanning part 8 which is controlled by a scanning control part 10. The intensity distribution pattern is thus measured. The light intensity signal from the tube 7 is further processed by an amplifier filter 11 and is applied as the intensity signal of the diffraction pattern of a control part 12. The information of the position on the plane 6 detected by the tube 7 in the part 8 is applied to the part 12 where the pattern distribution is constituted again and the difference from a reference pattern is subjected to digitalizing processing.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

Best Available Copy

⑩ 日本国特許庁 (J P)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭60-224041

⑬ Int. Cl. 4

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和60年(1985)11月8日

G 01 N 21/17
33/543

C-7458-2G
7906-2G

審査請求 未請求 発明の数 1 (全12頁)

⑮ 発明の名称 生理活性物質の検出方法

⑯ 特 願 昭59-80107

⑰ 出 願 昭59(1984)4月23日

⑱ 発 明 者	中 西	俊 晴	鎌倉市手広1111番地	東レ株式会社基礎研究所内
⑲ 発 明 者	村 尾	康 雄	鎌倉市手広1111番地	東レ株式会社基礎研究所内
⑳ 発 明 者	三 浦	久 美 子	鎌倉市手広1111番地	東レ株式会社基礎研究所内
㉑ 出 願 人	東 レ 株 式 会 社		東京都中央区日本橋室町2丁目2番地	

明 細 書

1. 発明の名称

生理活性物質の検出方法

2. 特許請求の範囲

微小粒子の凝集反応を利用して生理活性物質を検出する方法において、媒液中に分散する該微小粒子にコヒーレントな光を照射し、その回折パターンを測定して、それと未凝集試料の回折パターンとの比較から該微小粒子の凝集状態を定量化することを特徴とする生理活性物質の検出方法。

3. 発明の詳細な説明

〔技術分野〕

本発明は、免疫学的検査における生理活性物質の検出方法に関するものである。さらに詳しくは、粒子状担体に免疫活性物質を固定化してなる免疫活性粒子を用いてヒトまたは動物の体液中成分の検出、もしくは測定、あるいは細胞を識別する免疫学的検査法において担体粒子の凝集状態を光回折技術を用いて定量的に測定する生理活性物質の

検出方法に関するものである。

〔従来技術〕

生体の生理活性に関与する物質は限して微菌であり、しかも生体に対して非常に重要な役割を演じるものが少なくない。したがって、このような微菌の生理活性物質を検出することは医学、生化学等の生物関連分野にとっては重要であり、そのための種々の方法が考案され、実用化されている。そのうち、放射性同位元素、化学発光物質、蛍光物質などを用いて標識する免疫測定は非常に高精度であるが、装置が大がかりであり測定をするに当り特殊な技術を必要とする。さらにこの方法は結果を出すのに時間を要し、臨床現場などで直ちに結果を必要とする目的には不適當である。

また、簡便な方法として、目的とする微量物質を直接捕捉するのではなく、生理活性物質の大部分がそれと相補的な物質を選択性良く検出し、結合してコンプレックスをつくる事実を利用する方法（例えば抗原-抗体反応）がある。この場合、まず相補物質を微小担体に固定化させたものを適

当な媒体中に分散させる。そしてこれに目的とする物質を含む溶液を混合すると、両物質が選択的に結合することにより担体が凝集するので、その凝集状態を観察するのである。

凝集状態を観察するには、従来からいくつかの方法が用いられてきた。そのうち、マイクロプレート法は微小凹部に種々の濃度の目的試薬を入れ、一定時間経過後の沈降パターンの違いから陰陽の判定をするものである。しかしながら、この方法では定性的な比較判定を行なうためパターンに中間段階がある場合、その判定の境界に個人差が生じていた。またスリッピングという一種の沈降凝集塊の崩れによるパターンの乱れが生じた場合には判定を誤ったり判定不能となる場合があった。また、別の方法として顕微鏡で直接観察する方法もある。この場合には視野内の凝集塊の状態を見て同じく陰陽判定を行なう。しかし、この方法に於いても、視野による凝集状態のバラツキや観察者の主観などが入るので判定に個人差が生じやすい。さらに、従来から一般的に用いられていた粒

子は、概して $0.1\mu\text{m}$ 以下であり、可視光波長より短いものが多かった。そのため、粒子そのものは顕微鏡下では直接見えず、凝集状態は凝集が相当進行し、可視化できる大きさになって始めて認識できるため、弱い凝集の場合は判定が困難であった。また、これらの方法は熟練を要し、さらには人力によるため、多数の測定をこなすことが困難であった。

顕微鏡を用いる方法としては、濁度や光散乱強度を測定する方法などがある。例えば、凝集状態の変化を濁度の変化として光学的に見る方法としては、特開昭57-149951号公報に見られる技術や文献(LA-SystemによるCRP定量測定、J. J. C. L. A., VOL. 8, No. 1, p. 161~165, 1983)等を用いることができる。

これらの方法は装置を用いて結果を客観化できるという利点はあるものの、用いる試薬が多量であったり、また、試料を均一にするため攪拌する必要がある等、取扱い上に問題があった。さらに、

これらの方法では、被検液での透過光や散乱光の強度変化のみを見るというような散乱系となる凝集塊の情報の一部のみを利用するだけであり、例えば、不純物が混入しているような場合、それらを除去することが精度の良い測定に不可欠であったり、場合によっては、そのための複雑な前処理が必要となる場合があった。

以上説明した様に、従来技術においては、必ずしも得られたデータの再現性、客観性は十分であるとは言えなかった。

〔発明の目的〕

本発明の目的は、光回折技術を用いてこのような従来の方法の持つ欠点を改良し、観察者の主観による判定基準の曖昧さを除去して、凝集状態を客観的に、しかも少ない試薬量で定量化する生理活性物質の検出方法を提供することにある。

〔発明の構成〕

本発明は $0.5\sim 10\mu\text{m}$ 、より好ましくは $1\sim 6\mu\text{m}$ と光の波長と同程度か十数倍の微小粒子がコヒーレントな光によって生じる回折パターン

を光学的手段を用いて検出する。そして、その対象物たる微小粒子の凝集による外形形状および大きさの変化を回折パターンの変化としてとらえることにより、凝集状態に関する情報を数値化して、それによって凝集の程度まで定量化することを特徴としている。すなわち、本発明にかかる方法では、1点での光強度を測定するのではなく、光の分布状態を測定することによって凝集状態を判別するのであり、必然的に外来雑音に強く信頼性の高い測定結果が得られる。なお、回折パターンの認識には通常のパターン認識で使用する面積差、相互相関、あるいはマッチトフィルター等による手段が適用できる。

以下、本発明の原理について詳述する。

単一の波長の光によって照射される場に置かれた物体は、その光学的特性が周囲のものと異なっている場合(屈折率、反射率、透過率など)必ずその物体の持つ光学的特性や、大きさ、形状に応じて光と相互作用し、独自の回折光を生じせしめる。この様な微小粒子を均一な光学的な場に置い

た場合に得られる光の回折については色々な場合について論じられている。例えばごく基本的に微小粒子が光学的に不透明である場合、しかもそれが球形形状をしている場合については次に述べるような文献に詳細に議論されている。

Principles of Optics Max Born
& Emil Wolf

Pergamon Press p. 395

以下、上記の文献に従い第2図を用いて、本発明の原理について説明する。今、簡単のため、均一な平面光波の場になされた粒子Sが1個ある場合を考える。ただし、Sは球形形状でその直径はRであるとする。

Sがレンズ(焦点距離f)を介して焦点面上に作るフラウンホーファー回折パターンの強度分布は、

$$I(X) \propto \left(\frac{2J_1(X')}{X'} \right)^2 \quad (1)$$

と表わせる。ここでI(X)はレンズLの焦点面

上で、かつ光軸中心Oから距離Xにある点Pでの強度であり、 J_1 は1次のベッセル関数である。

ここでX'は、

$$X' = \frac{\pi}{\lambda} \cdot R \cdot \frac{X}{f} \quad (2)$$

と表わせる。

なお、 λ は用いた光の波長、fはレンズLの焦点距離である。もし粒子Sが1個だけではなく同じ形状のN個の粒子が分散して存在するのであれば、各々の粒子の回折波面を焦平面上で位相を考慮して加算し、それを2乗したものが回折パターンの強度分布となる。しかしこの場合、平行光束により照らされたN個の粒子の回折光波の互いの位相関係はランダムであり、回折粒子が十分に多い時には事実上、統計的に無相関であると考えることが可能である。この条件は実際上、第2図のような光学系では十分満たされている。なぜなら、たとえ、十分コヒーレントな光で照明したとしても、担体粒子を分散させている媒体溶液の屈折率

ゆらぎ、粒子表面の微細な反射率の分布等により、互いの粒子間の回折波の位相関係は乱れてしまうからである。

上述の理由によって、この様なN個の粒子がある場合、それらのP点での光強度のフラウンホーファー回折パターンの強度は粒子の位置によらないので(但し、位相は粒子の位置によって異なる)。

$$I(X) \propto N \cdot \left(\frac{2J_1(X')}{X'} \right)^2 \quad (3)$$

とN個の個々の粒子の回折パターンの強度の重ね合せとして示される。

今、本発明における場合を考えると、凝集反応が生ずる前には、多数の粒子は互いに同じ形状で各々独立に媒体中に分散している。これらの粒子の作る回折パターンは(3)式で示される強度分布を持っており、粒径がそろっている場合には、式中のX'に含まれる粒径Rが一定のため全体のパターンはぎわめて規則的なものとなっている。凝

集が進行し、各々の粒子が互いに結合してくると、見かけ上の粒径がRと異なるものが生じてくる。

(3)式で容易に判るように粒径が異なる場合ベッセルで示される J_1 の周期パターンの周期がそれぞれの粒径ごとに異なり、それがP点上で重ね合わされることとなり、最初の規則パターンが崩れてくることになる。この均一分散の示すパターンからのずれは生じた凝集塊の程度に忠実に対応している。

ここで、実際に用いられる担体粒子が透明であるような場合には上述の単なる形状による回折パターンのみでなく、内部に入る屈折波や、内部での多重反射波による回折パターンへの寄与も厳密には考慮する必要があるが、本発明における基本パターンからの変化として凝集塊の生成を判定する場合、各々の粒子が光学的にほぼ同等と見なせ、また各々独立に回折パターン強度に寄与するという条件下では、このような厳密な考察は必要でなく、結果として、ここで述べたような回折パターンの変化として凝集生成をとらえられることは明

第1表. 凝集反応検出に使用できる分野

粒子に固定する物質	検査項目
Treponema pallidum抗原	梅毒
抗HBs抗体	B型肝炎
HBs抗原	抗HBs抗体
風疹ウィルス抗原	風疹
トキソプラズマ抗原	トキソプラズマ
ストレプトリジン-O	溶連菌
ヒト絨毛性ゴナドトロピン(HCG)	妊娠
抗HCG抗体	妊娠
熱浸漬ヒトIgG	リウマチ因子
DNA	膠原病
抗C-蛋白抗体	組織崩壊または炎症
抗α-フェトプロテイン抗体	肝癌
抗C3a抗体	補体活性化
抗C5a抗体	補体活性化
コングルチニン	免疫複合体
C1q	免疫複合体

らかである。

本発明における微小担体粒子としては、ヒトを含む哺乳動物や鳥類の赤血球、カオリン、炭素などの無機物の粒子、天然ゴムラテックスやポリスチレン、カルボキシル化スチレン-ブタジエンコポリマー、アクリロニトリルポリマー、塩化ビニル-アクリレートコポリマー、メタクリル酸ポリマー、さらには、メタクリル酸グリシジル共重合体などの有機高分子化合物のラテックスなどを用いることができる。なお、このような担体粒子に固定化し、免疫学的な生理活性物質の検出に利用することができると思われる物質と、それにより検査できると考えられる項目の一例を第1表に掲げる。

また、本発明は単に生理活性物質を固定化するための微粒子担体としてではなく、例えば血小板自体の凝集反応の測定や、赤血球、白血球細胞の形状の変化や分布を測定したり、形状の異なる異種細胞の識別にも利用でき、さらには特定の細胞と選択的に結合する物質を固定化した粒子状担体を用いて、その粒子が細胞と結合するか否かによって細胞を識別するというような手段にも利用可能である。

さらに言及すれば、本発明はこのような生物的分野に限らず、高分子ラテックスの粒径分布の測定や該ラテックスの液中での分散状態のモニターにも応用でき、また、無機物質、例えば金属等の微粒子やセラミック微粉末の粒径分布の測定等にも用いることができる。あるいは、微粒子の製造工程での製品の品質管理で本発明の方法による回折パターンを基準パターンとして製品ロットごとのパターンと比較し、両者の差が一定の範囲内に収まるようにロット管理に適用するような使用方法にも本発明の原理が適用可能であることは明らか

である。

以上詳述した様に、本発明は本質的に周知と光学的に差異のある微粒子の形状、大きさ、結合状態やその変化を光回折技術を用いて検知し、それらの情報を数値化、定量化する生理活性物質の検出方法であり、以上に述べた様な微粒子を用いる限り、本発明の目的に対して特に支障のあるものではない。

第1図は本発明を実施するために用いた測定装置のブロック図である。レーザ等の光源1から出た光ビームはエクスパンダ2、アパーチャ3で適当な大きさの平行光束にされた後、試料セル部4に照射される。試料セル部4には試料保持機構部15が付いており、コントローラ部12で温度制御等が可能である。4で回折された光はフーリエ変換レンズ5で焦平面6上に回折パターンとして結像され、その強度分布は光電管7を用いて測定される。7はスキャン部8によって6上を走査され求める強度分布パターンを測定する。スキャン部8は走査制御部10で制御され、受光部7が

検出している6上での位置情報をコントローラ部12に与える。一方、7で得た光強度信号はアンプ・フィルタ部11で処理され、回折パターン強度信号としてコントローラ部12に与えられる。コントローラ部12は、これらの情報をもとにパターン分布を再構成する。そしてコントローラ部12は基準パターンとの差をしかるべき手順で数値化したり、グラフ、あるいは粒径分布の計算等の処理を行なう。

この様にして得た結果はディスプレイ装置13に出力される。

実施例1

第3図には、本測定法で求められた粒体の回折強度パターンを示してある。用いた試料の調整方法は次の通りである。メタクリル酸グリシジル、メタクリル酸2-ヒドロキシエチル及びトリエチレングリコールジメタクリレートを85.7/9.5/4.8(モル比)の割合で、プロピオン酸エチルと四塩化炭素(重量比1:1)からなる溶媒中で混合し、V-65を開始剤として45℃、

16時間で共重合した。この粒子をアセトン中ピクトリアブルーを用いて青色に染色した後、8%アンモニア水溶液で40℃、2.5時間処理してメタクリル酸グリシジル由来のエポキシ基をアミノ基とした。さらに、0.16%希硝酸水溶液中で50℃、24時間処理して残存エポキシ基を加水分解開環した。このように、調整した粒子を過ヨウ素酸ナトリウムで酸化したアルギン酸ナトリウムの水溶液で処理し、洗浄し、リン酸バッファ-中ウシ血清アルブミン(BSA)と反応させ目的とする粒子を得た。以下、この粒子をBSA固定化粒子と略す。

このBSA固定化粒子をさらに洗浄後、ヒト血清アルブミン(HSA)を1%含むリン酸バッファ中に分散させ、容積比で0.0625%に混ぜたものを用いた。顕微鏡で均一に分散していることを確認後、試料セル部に注入し、その回折パターンを光電管を介して測定した。要した試液量は22 μ lであった。

第3図(a)は粒径3 μ mのBSA固定化粒子

の場合であり、焦点距離125mmのレンズを用い、焦平面上での光軸位置を原点とし、X軸は原点からの距離、Y軸は回折パターンの強度に原点からの距離を掛けたものを示してある。これは、粒径による周期的な回折パターンを強調するために行なった演算処理であり、データ自体の判定には全く関与しない処理である。

第3図(b)は同じく6 μ m径のものである。両者を比較すると、明らかに粒径の違いによる回折パターンに差が生じている。

第3図(c)は全体の粒子濃度が同じく0.0625%となるようにし、各々6 μ mと3 μ mの粒径のものを等濃度で1:1の割合で混合したものである。(a)と(b)の各々の周期性の中間の状態が表われている。これは両者の粒径のものの混合比を連続的に変えることにより、(a)から(b)へと連続的に変わるものである。

この様に本発明による測定法に於ては、異なる粒径のものが混在することにより回折パターンが変化し、その変化の程度は混合比により一意的に

決る。例えば、凝集により均一な粒径の分散系の内に凝集塊が生じた場合、その塊は異なる粒子として回折を生じ、ここでの図(c)の様にもとの基本パターンとずれたパターンを与える。

実施例2

第4図は粒径3 μ mのBSA固定化粒子を用いた濃度0.125%の分散溶液に、所定の抗BSA抗血清液を倍々希釈していったものをそれぞれ1:1の容積比で混入し、最終粒子濃度を0.0625%に調整し、数分間劇振し、2時間静置後、沈降したものを再びごくゆるやかに震盪させ、スポイトで試料セル部に注入し、本発明による測定法で回折パターンをとったものである。なお、各試料は、従来法と比較するため、マイクロプレート法でも同じ濃度で測定し凝集の有無を判定した。さらには必要に応じて顕微鏡下でも観察した。データに見られる周期性は主に(3)式でのベッセル関数 J_1 から出ている。データ処理として、個数Nのバラツキによる寄与をなくするため、各々第2希目のピークで規格化し、さらには

強度 I に原点からの距離 X の 2 乗をかけて縦軸 I normal は

$$I \text{ normal} \propto \log [J_1^2(X')] \quad (4)$$

となるように計算処理を施した。

第 4 (a) 図は抗 BSA 抗血清原液を 320 倍希釈したもので、①は比較基準 (以下、コントロールと称す。) 用に抗血清を含まない液、②は含む液を用いたものである。以下、①、②の意味は全て同じである。(b) は 1280 倍希釈、(c) は 2560 倍、(d) は 5120 倍希釈である。

希釈度が増すに従い、抗血清濃度が下がるため、マイクロプレート、顕微鏡でいずれも凝集反応は生じにくくなっている。本発明の方式の結果では①のコントロールに対する回折パターンの変化は 320、1280 倍は大体同じであるが、2560 倍では違いは少なくなり、5120 倍希釈では①のコントロールと②との差は殆どなくなっている。マイクロプレート法では 5120 倍は

陰性、320、1280 倍は陽性で 1280 倍は判定の境界であった。両者を比べて陰陽判定ではマイクロプレート法と同じ結果となった。

また、顕微鏡観察では 2560 倍は凝集しているものの、320、1280 倍に比べ、凝集塊が視野内で少く、塊の大きさもかなり小さかった。定量的な判定をするため、一例として、このグラフ上での①と②の両者の面積差を $X = 25 \text{ mm}^2$ から 75 mm^2 の間で比べて見ることとすると、第 2 表に示すように 5120 倍に比べ 320 倍と 1280 倍は共におよそ 8 倍程度の差があった。

第 2 表

	希 釈 度 (倍)			
	320	1280	2560	5120
面積差 (cf)	8.34	8.28	3.67	0.95

また、中間である 2560 倍では値も中間の値を示し、顕微鏡観察とよく対応して定量的性もある

ことが明らかである。

他の判定法としては例えば、周期パターンの山と谷との差の大小をもとることができる。この方法でも上述の様な判定が正しく行なえることは図を見ても明らかである。

実施例 3

第 5 図は粒径 $6 \mu\text{m}$ の BSA 固定化粒子を、濃度 0.125% の分散溶液に調整し、抗 BSA 抗血清液原液を所定の倍率に希釈したものと、コントロール用として抗 BSA 抗体を含まない血清液を同倍率に希釈したものとを用い、両者を比較したものである。

混合比は共に 1:1 とし、コントロール、試料共、粒子の最終濃度は 0.0625% に調整した。また、凝集状態の比較検証のため、同希釈度でのマイクロプレート法測定、顕微鏡下での観察も同時に行なった。ここでは、640 倍と 1280 倍に希釈した 2 例について掲げている。マイクロプレート、顕微鏡共にコントロール用試料では凝集は観察されず、抗体含有血清を用いたものでは

640 倍は凝集 (陽性)、1280 倍は未凝集 (陰性) となっていた。

ここでは、測定における光学系からの反射、透光等の測定データへの影響を除くため、試料セル部にブランクデータ測定用として蒸留水を注入し、焦平面での強度パターンデータを取り、それをバックグラウンドデーターとして利用した。

目的とする試液、コントロール液を用いて各々回折強度パターンデータを測定後、バックグラウンドデータを引き、次いで原点からの距離の 2 乗を掛けることにより、演算後の強度データ I normal を得た。

$$I \text{ normal} \propto J_1^2(X') \quad (5)$$

第 5 図の (a)、(b) 共に①はコントロール、②は試液での I normal 対 X を示す回折パターンである。

結果は明らかに 640 倍 (a) では凝集によるパターン変化 (コントラスト低下) が観察され、

1280倍(b)ではその差は小さい。マイクロプレート法、顕微鏡観察と一致した結果となっている。

Xが25mm~75mmでの④と⑤の本グラフでの面積差は(a)では10.8%、b(b)では2.90%と約3.7倍の差があった。

実施例4

第6図は試料セル部において、試料注入後の凝集の進行を経時的に観測したものである。3μm粒径のBSA固定化粒子を用い、粒子担体濃度は0.125%に調整し、抗体としては抗BSA抗血清液を1280倍に希釈したものを粒子含有液と同容量用意した。測定に先立ち、コントロール用として、抗体を含まない血清液を同じく

1280倍に希釈し、粒子含有液と1:1に混合し、最終粒子濃度を0.0625%に調整した。実施例3の場合と同じようにして、バックグラウンドデータを取り、上記コントロール液での測定パターンデータから減算し、次いで原点からの距離の2乗を引いたものを第6図(a)、(b)の

④のコントロールデータとした。経時変化測定のデータ第6図(a)、(b)の⑤についてもデータ処理はこれと同様に行なった。

前記の粒子含有液と抗体含有希釈血清をt=0で1:1に混合し、最終粒子濃度を0.0625%としてt=8分経過後に測定したものが第6図(a)の⑤であり、t=171分後が第6図(b)の⑤である。この測定と同時に試験管内にこの混合液の一部をとり、本発明による測定法での測定と同時間後(8分、171分後)に顕微鏡下で直接凝集状態を観察した。

その結果、この実施例における試料では8分経過では非常に凝集が弱く、171分後も凝集が進行するが、凝集程度は低く、凝集塊もあまり大きくならなかった。

ここで(a)、(b)共にコントロールと比較し、その回折パターンの変化を定量化するにあたり、原点からの距離Xにおける④と⑤の両者の強度の差の絶対値を求め、グラフ上で両者の差が3mm以上ある部分のみの強度差に対応するところ

の面積のみを求めた(3mmにスレッシュホールドを設定)。これはコントロールと測定データとの差が小さい場合、全体としてパターンに差が無くても、両者は完全に重なることはあり得ず、実施例1~3のように面積を求めた場合、この僅かな違いも積分の内に入り、パターンの差の有無判定における本方式での定量化のダイナミックレンジを下げるためである。このことを示したのが(a)、(b)での下部でのパターンであり、これは両者④と⑤の差を約3倍拡大したもので、1点鎖線は3mm差に対応するスレッシュホールドレベルを示す。これより大きい差の出ている部分のみが面積差算出に於いて寄与する部分である。計算にあたってはX=25mmから75mmの範囲を用いた。この方法で算出した面積は(a)では0.70%、(b)では3.74%と約5倍の差を示した。

両者④と⑤の差を示す各図下部のパターンでは、171分後のものの方がスレッシュホールドレベルを越すものが圧倒的に多く、顕微鏡観察での弱い凝集ながら、経時的に凝集が進行することと良

く対応している。なお、スレッシュホールドレベルは本発明に於いて、ここで述べた方法に限定されるものではなく、例えば測定系に合せて上下させたり、またXに対応して適当に重み付けしたりしても何ら差支えがないことは言うまでもない。

このように本発明によれば、従来人力で行なっていた凝集判定法とよい対応をする測定が人手を介さず、また定量化させて行ないうる。さらには、経時的な凝集状態変化も、定量的に容易に自動化し得る形で行なうことができる。

さらに言及すれば、回折強度パターンをさらに詳細に検討することにより、凝集塊分布、凝集塊形状についての解析にも利用可能であり、さらには異なる粒子径を持つ分散液での粒子分布についての解析にも利用できることは言うまでもない。

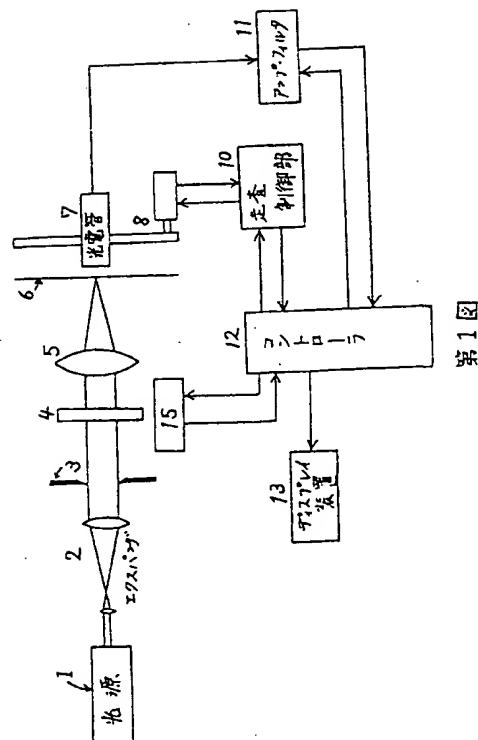
4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明を実施するのに用いた測定装置の構成を示すブロック図、第2図は本発明における測定原理を説明するための図である。

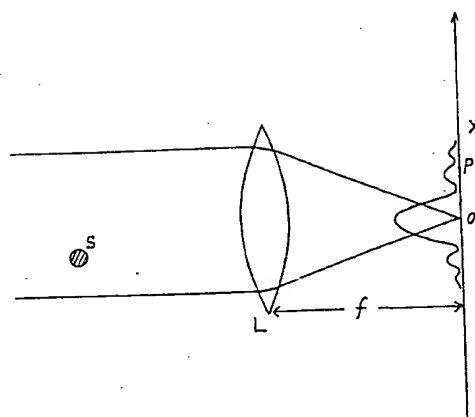
第3図は、3μmと6μmの粒子とそれらの凝

合光子を用いて、測定された回折パターンデータで、粒径による違いを示す図、第4図、第5図は、それぞれ本発明の実施例であって抗BSA抗血清濃度による凝集程度の違いを測定した回折パターンデータの差として示した図、第6図は、本発明の実施例において凝集反応の経時変化を回折パターンの変化として測定した結果を示す図である。

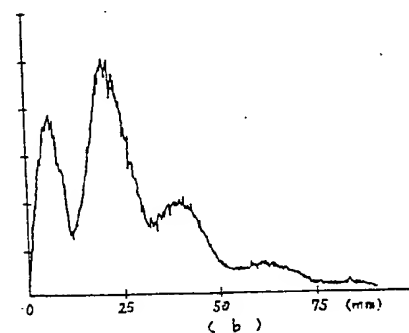
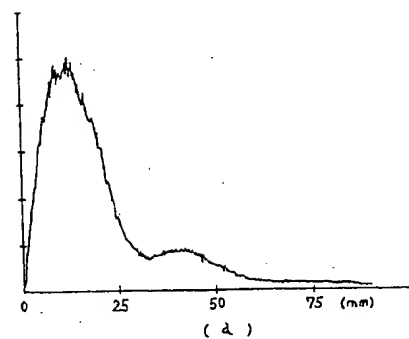
特許出願人 東レ株式会社



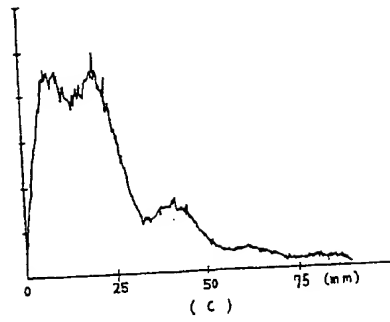
第1図



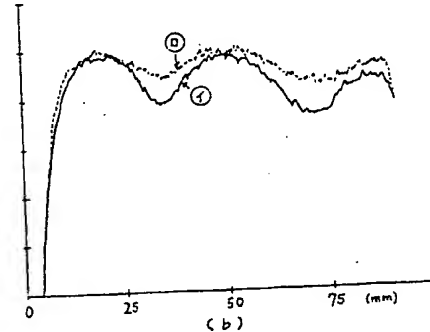
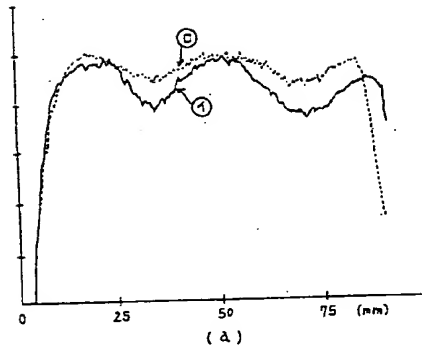
第2図



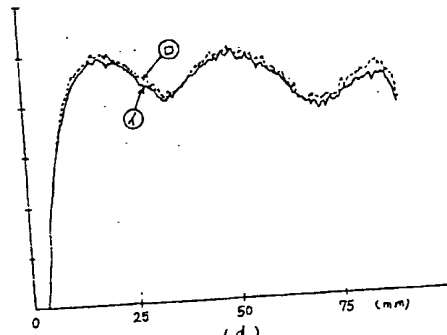
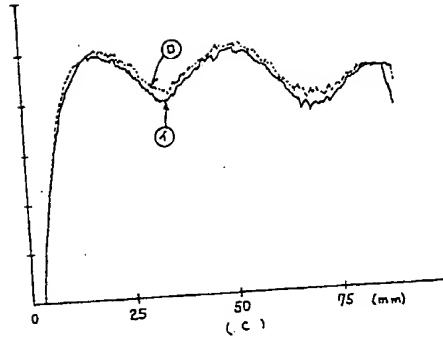
第3図



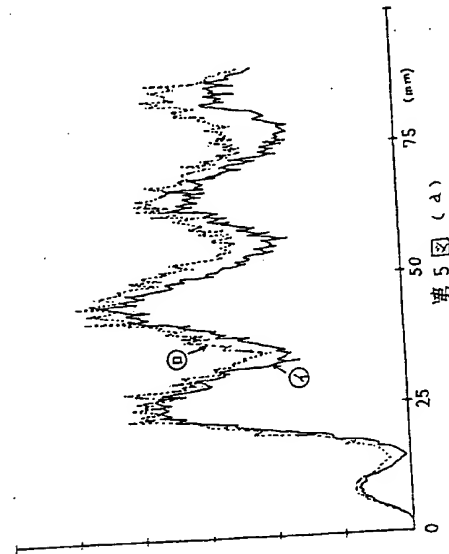
第3図



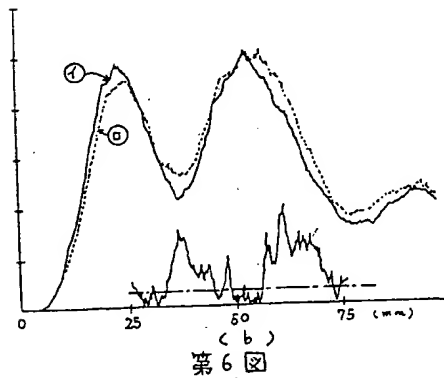
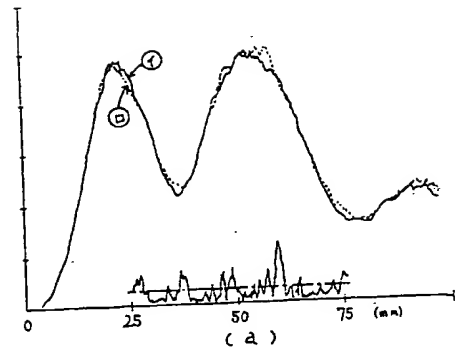
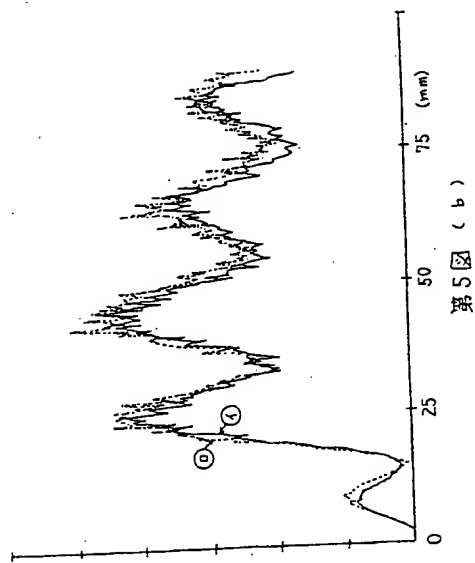
第4図



第4図



第5図



手続補正書

昭和59年12月21日

特許庁長官 志賀 学 殿

1. 事件の表示

昭和59年 特許願 第80107号

2. 発明の名称

生理活性物質の検出方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人
住 所 東京都中央区日本橋室町2丁目2番地
名 称 東レ株式会社
代表取締役社長 伊藤 昌 奇

4. 補正命令の日付 自発

5. 補正により増加する発明の数 0

6. 補正の対象
明細書の「発明の詳細な説明」、「図面の簡単な説明」
の各欄および図面

7. 補正の内容

(1) 明細書5頁下から3～2行目

「本発明は0.5～10 μm 、より好ましくは1～6 μm と光の波長と同程度か十数倍の」を

「本発明は0.1～10 μm 、より好ましくは0.1～6 μm と光の波長より少し小さいか十数倍の」に補正する。

(2) 明細書6頁下から6行目～7頁13行目

「単一の波長の光…Rであるとする。」を

「光と物体の相互作用において、光の波長に対して物体が十分小さく近似的に点と見做してよい場合の散乱をレイリー(Rayleigh)散乱と言う。この場合には一般的に散乱体の形状に関する情報は含まれていない。一方、物体が波長より少し小さいか同程度以上である場合、物体内の各点からの散乱光は互いに干渉する。これを回折ともいう。この回折パターンは物体内各点からの散乱光を位相も含めて全体積にわたり積分するため、その物体の持つ光学的特性、大きさ、形状などの情報が反映している。本出願において扱う粒子は丁度後

者の場合に相当している。この様な微小粒子を均一な光学的な場に置いた場合の光の回折については色々な場合について論じられている(Mie, Debyeの理論等)。ここで本出願の意図する所を判りやすくするために話をごく簡単化して説明する。すなわち、微小粒子が光学的に不透明で、しかもそれが球形形状をしており、その断面形状より円形の吸収体であるとする。この場合については次に述べるような文献に詳細に議論されている。

Principles of Optics Max Born
& Emil Wolf

Pergamon Press p. 395

以下、上記の文献に従い第2図を用いて、本発明の原理について説明する。今、簡単のため、均一な平面光波の場所に置かれた粒子Sが1個ある場合を考える。ただし、Sは上記のような仮定を満し、その直径はRであるとする。」に補正する。

(3) 明細書第10頁3行目

「粒径が異なる場合」を削除する。

食塩緩衝液で倍々希釈してRA因子濃度を変え、実施例4と同様なデータ処理により、コントロールでの回折パターンとの面積差として凝集度を算出し縦軸とした。横軸は希釈倍率である。希釈によるRA因子濃度の減少と凝集度が良く対応しているのが判る。なお、陰性血清でも同様に希釈し、測定の再現性を見たのが図中の■印である。これから希釈倍率を変えても陰性血清では凝集度は変化せず、ラテックスの分散状態が変わらないことが判る。この結果は顕微鏡観察と良く一致し、本発明が粒子の分散状態を再現性良く測定し得ることを示している。この試薬はガラス板上での凝集の有無を単に肉眼で定性的に判定するよう開発されたものであるため、定量性は保証されていないが、本発明によれば、この様な試薬でもある程度の定量測定ができることを示している。なお、測定は、試薬をマイクロプレート上で混合攪拌後第5図(a)に示すようなセルに注入して行なった。

実施例6

第8図は、 α -フェトプロテイン(AFP)用

(4) 明細書第14頁下から7行目

「15が付いていおり」を

「15が付いており」と補正する。

(5) 明細書第25頁10行目

「拡大したものであ、」を

「拡大したものであり、」と補正する。

(6) 明細書第26頁6行目

「このように本発明…」の前に次の文章を挿入する。

「実施例5

次に市販のラテックス試薬を本発明に適用した例について述べる。第7図は、リユーマチ因子(RA因子)検出用試薬キットを用いて得た凝集度と希釈度の対応結果である。使用ラテックスの粒径は $0.5\mu\text{m}$ 以下であるため、光学顕微鏡では粒子形状を明瞭に観察できない。

コントロールとしてキット内同封の対照陰性血清を用い、さらに同封の対照陽性血清をグリシン

の定量分析ラテックス試薬を用いて同様な測定を行なった結果である。ラテックス粒径は約 $0.2\mu\text{m}$ である。データの処理や測定試薬セル作成方法等は実施例5の場合と同様である。この試薬は定量用として凝集度がAFP量に対して連続的に変化するように調整されてある。縦軸が凝集度、横軸がAFP濃度を示す。この結果から、AFP濃度約 $12.5\text{ng}/\text{ml}$ 以上で凝集し始め、その濃度増加と共に凝集度が向上することが判る。なお、コントロールとしては凝集を生ぜしめないウマ血清を用いた。複数のコントロール試液間での回折パターンの相違、すなわち、凝集度データのバラツキは十分小さく、再現性の有ることは第7図の場合と同様であった。

実施例5および実施例6は、本発明に係る方法が、波長よりも小さい粒子を用いる凝集試薬にも適用でき、かつその結果も定量的な評価が出来るものであることを示している。前述した様に従来市販されている粒子は $0.5\mu\text{m}$ 以下のものが多く、それらがそのまま本発明の方法に適用できる

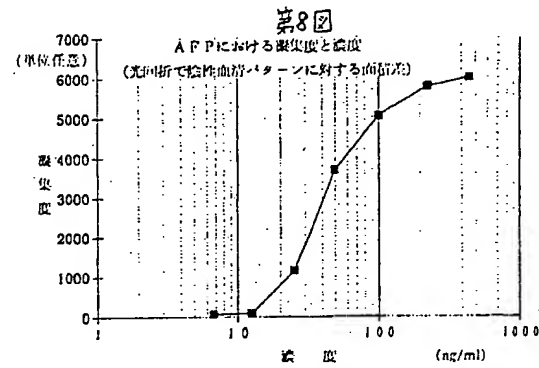
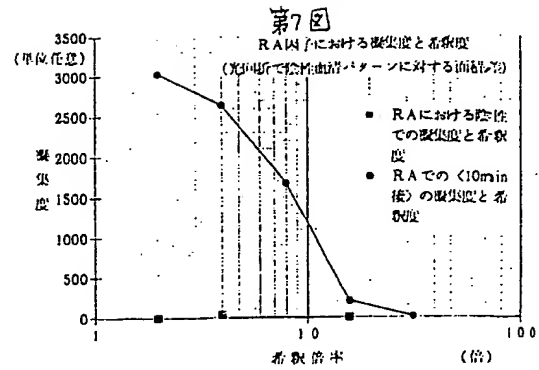
ことは有意義であると言える。

(7) 明細書27頁7行目

「…結果を示す図である。」の次に

「第7図は本発明の実施例としてリユーマチ因子検出用試薬キットを用いた場合の凝集度と希釈度の対応を示す図、第8図は、本発明の実施例としてAFP用の定量分析ラテックス試薬を用いた場合の凝集度と濃度の対応を示す図である。」を挿入する。

(8) 別紙の図面、第7図および第8図を追加する。



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.